文章编号:1000-5404(2014)09-0923-05

论著

金黄色葡萄球菌转座文库构建与持留突变株研究

姜 北,黎 庶,张骁鹏,于俊媛,袁文常,胡启文,饶贤才,胡晓梅 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物教研室,重庆市微生物工程实验室)

[摘要] **目的** 利用Tn917转座子构建金黄色葡萄球菌(简称"金葡菌")转座突变文库,从构建好的文库中筛选到持留性突变菌株。**方法** 将含有Tn917的pID408质粒电转化入金葡菌Newman株,利用高温及红霉素诱导使其发生转座作用,建立转座子文库并对其进行质量评价;通过对稳定期24 h及36 h菌液予以100 MIC达托霉素处理,之后计数活菌数目的方法,比较文库中筛选到的特定菌株T18、T18s与野生株的持留性差异。**结果** 建立了金葡菌Newman株转座子文库,从中随机挑取19个文库子,进行转座子插入位点测定,证实其插入随机性良好。在培养24 h和36 h两个时相点,野生株、T18及T18s株之间持留性存在不同程度的差异。**结论** 成功构建了插入随机性良好、可用于多种研究的金葡菌转座子文库,并从中得到持留性变化菌株,且不同生长时间点各株细菌之间表现出持留性差异。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;转座子文库;持留性
[中图法分类号] R372; R378.11; R394-33 [文献标志码] A

Construction of *Staphylococcus aureus* transposon library with transposon Tn917 and identification of mutants with altered persistence

Jiang Bei, Li Shu, Zhang Xiaopeng, Yu Junyuan, Yuan Wenchang, Hu Qiwen, Rao Xiancai, Hu Xiaomei (Department of Microbiology, Chongqing Laboratory of Microbiological Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To construct a transposon (Tn917) library of *Staphylococcus. aureus* (*S. aureus*) Newman strain, and then identify the mutants with altered persistence. Methods Plasmid pID408 with transposon Tn917 was transformed into *S. aureus* Newman strain by electroporation, and high temperature and erythromycin were employed to induce transposition. Then a transposon library was constructed, and its quality was evaluated. After treating with 100MIC daptomycin for 24 and 36 h, 2 specific mutant strains (T18 and T18s) were screened out, and their persistence were compared with that of wild type. Results The *S. aureus* Tn917 library was constructed, and 19 strains out of the library were randomly picked to identify their insertion sites. The results showed a good randomness. At the time point of 24 and 36 h, the wild type, T18 and T18s strains presented different persistence to some extent. Conclusion A *S. aureus* transposon library with good randomness is successfully constructed, which could be used for various purposes. And 2 specific mutant strains with altered persistence are screened out from it. The wild type, T18 and T18s strains show persistence difference in 24 and 36 hours' culture.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; transposon library; persistence

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5026, CSTC2011jjA10050). Corresponding author: Hu Xiaomei, E-mail: hxmay2008@163.com

金黄色葡萄球菌是人类的一种重要致病菌,可产生多种毒力因子,引起全身多部位的多种感染,对人类危害甚大[1]。而金葡菌生物被膜与其致病性及感染难愈性密切相关,在其逃避宿主及抗菌药物杀伤作用

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5026,CSTC2011jjA10050)
[通信作者] 胡晓梅, E-mail: hxmay2008@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1114.018.html(2013-12-20)

中扮演重要角色[2-3]。持留菌(persister cells)是存在于某个细菌群体中一定比例的表型异化小亚群,常表现为临时休眠或缓慢生长状态,可耐受致死浓度抗生素的作用,但这种抗生素耐受性并非稳定遗传,当持留菌被再次于新鲜培养基培养时,细菌中绝大多数对抗生素仍然是敏感的,最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)不变,而只有一定比例的持留菌产生[4]。持留菌被认为与生物被膜形成及慢性感染的反复发作与难愈性密切相关,故在抗感染治疗中具有重要意义,甚至有学者将其与细菌耐药性相提并论[5]。虽然持留菌最早在金葡菌中发现,但目前对金葡菌持留机制却知之甚少,国际上持留菌相关研究多集中于大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、结核分枝杆菌,而国内目前对持留菌的研究仅限于结核分枝杆菌,对金葡菌持留性相关因素及机制的研究亟待深入。

目前,研究细菌持留性相关基因的方法主要包括构建转座子文库、定点敲除文库、表达文库,以及进行转录组分析等[2]。其中,构建转座子文库是筛选持留性相关基因的重要手段。转座子Tn917可在高温及红霉素诱导作用下发生转座作用,Cucarella等[6]利用Tn917建立了金葡菌转座子文库并筛选到生物被膜相关基因,但该文库尚未商品化,且目前国内尚无利用Tn917建立金葡菌转座子文库的相关研究报道。为此,本研究拟利用转座子Tn917构建金葡菌Newman株转座突变文库,并从中得到持留性变化菌株,以期为深入探讨金葡菌的持留机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 金葡菌RN4220为限制系统缺陷菌株,可接受并修饰来自大肠埃希菌的穿梭质粒,由中国科学技术大学孙宝林教授惠赠;金葡菌Newman株用于建立转座子文库,由吉林大学于录教授惠赠;T18菌株为*pyrD*基因的转座插入突变株,筛选自金葡菌Newman株转座子文库,T18s菌株为*pyrD*基因的转座插入突变株衍生株。温度敏感性穿梭质粒pID408具有氯霉素抗性基因,该质粒内含具有氨苄青霉素及红霉素抗性的转座子Tn917,由我室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 限制性核酸内切酶、T_4 DNA连接酶购自TaKaRa公司;红霉素(ERY)、氯霉素(CHL)、氨苄青霉素(AMP)、环丙沙星(CIP)购自BBI公司,实验中AMP应用浓度为100 μg/mL ,ERY、CHL应用浓度均为20 μg/mL;达托霉素(DAP)购自大连美仑生物技术有限公司;质粒抽提试剂盒购自Promega公司;细菌基因组DNA提取试剂盒、DNA产物纯化试剂盒、大肠埃希菌DH5α化学转化感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司;TSB (Tryptone Soya Broth)、BHI (Brain Heart Fusion)培养基购自Oxiod公司;溶葡萄球菌素购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 金葡菌RN4220/Newman株电转感受态制备 将1 mL过夜菌(RN4220/Newman)接种至100 BHI培养基,37 ℃ 200 r/min培养1 h至$D(600)\approx0.4$,冰浴30 min;4 ℃ 5 000 r/min离心菌液,以0.5 mol/L蔗糖溶液轻柔重悬、洗涤,重复3次上述操作,最终以300 μL 0.5 mol/L蔗糖溶液重悬,制得金葡菌电转感受态。

1.2.2 质粒pID408电转化金葡菌RN4220/Newman株 提取自大肠埃希菌DH5α的质粒pID408首先电转入金葡菌RN4200,经其修饰后再电转入金葡菌Newman株。电转化条件:0.2 cm电极杯,2.5 kV,200 Ω,25 μF。电转时以8 μL质粒加入到100 μL电转感受态中,电转复苏后涂布于ERY-CHL双抗平板,于30 ℃培养。挑取平板上单菌落提取质粒,*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ双酶切验证质粒pID408是否成功转入RN4220/Newman株。

1.2.3 诱导Tn917转座作用 挑取经验证成功转入质粒pID408的金葡菌Newman株,于ERY-CHL双抗TSB中培养至稳定期,取该菌液5 μL加入5 mL TSB(此时混合液含有低浓度ERY),43 ℃ 250 r/min培养18 h,诱导Tn917发生转座。取上述菌液约5 μL加入150 μL TSB,混匀后涂布于ERY抗性平板,43 ℃培养约24 h,初步获得转座子文库。

1.2.4 转座突变株的筛选 从上述平板上用无菌牙签随机挑取100个菌落,分别划种于ERY单抗、ERY-CHL双抗平板上,于37 ℃孵箱培养过夜。在ERY抗性平板上生长,而在ERY-CHL双抗平板上不生长者为成功发生转座作用的插入突变株。

1.2.5 文库评价 随机挑取19个上述成功发生转座作用的插入突变株,确定其转座子插入位点,对转座子插入的随机性做初步评价。确定转座子插入位点方法[6]:提取转座子插入突变株基因组,*Eco*RⅠ酶切后纯化酶切产物,取8 μL上述产物,加入1 μL T_4 DNA连接酶及其缓冲液1 μL,16 ℃进行自连反应16 h,此时含有Tn917片段与转座子插入区基因组片段的DNA序列可以组成AMP^r质粒,将连接产物化转大肠埃希菌DH5α,涂布AMP^r平板。为确定转座子插入处基因组序列,挑取AMP^r转化子培养,利用距Tn917近红霉素抗性基因端(erm-proximal)70 bp处的反向重复区域设计测序引物:5′-AGAGAG-ATGTCACCGTCAAGT-3′。转化子菌液样本送华大基因进行测序,以确定转座子插入位点。

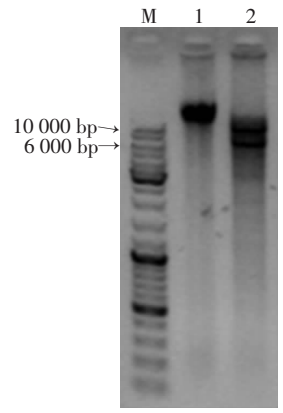
1.2.6 野生株、T18、T18s株持留性实验[7] T18为转座子Tn917插入金葡菌Newman株pyrD基因的突变株,插入位点位于pyrD基因序列第123与124位之间。查询GenBank得知pyrD基因编码产物为二氢乳清酸脱氢酶2,在嘧啶合成途径中催化二氢乳清酸转变为乳清酸盐,同时为呼吸作用中的电子受体醌类提供结合位点。由于嘧啶合成缺陷的菌株在抗菌药物作用下可能产生小菌落[8],故尝试将对数期T18菌株以20 MIC CIP作用

8 h 后,菌液涂布无抗 TSA(胰蛋白胨大豆琼脂)平板,发现其中长出一些较小菌落,挑取小菌落再培养后,证实该表型稳定遗传,将该 T18 菌株的小菌落衍生株命名为 T18s(T18 small)。细菌 MIC 实验根据 CLSI 相关规范进行;采用酶标仪进行野生株、T18、T18s 株生长曲线测定,培养条件为 37 ℃,200 r/min。持留性实验中,以 100 MIC DAP 分别作用于 3 株细菌的培养 24、36 h 的稳定期菌液,作用时间为 8 h,细菌培养条件为37 ℃、200 r/min;在 DAP 作用前后计数活菌数目,计数方法采用滴板计数(drop plate),具体操作为:取菌液 100 μL,以 1% NaCl 梯度稀释(DAP 作用组先沉淀细菌,以 1% NaCl 洗涤去除 DAP),选取合适的梯度稀释组,用移液器每稀释度组取 10 μL 滴于 TSA 平板,每稀释度组做 5 次重复滴板,待液滴吸收干燥后,倒置平板转移至 37 ℃孵箱培养;培养后计算每稀释度组平均菌落数目,进而得出特定时间点的活菌数目。计数结果应用 SPSS 13.0 行单因素方差分析。

2 结果

2.1 质粒 pID408 电转化金葡菌 Newman 株

含有转座子 Tn917 的 pID408 质粒首先电转化入金葡菌 RN4220,经修饰后再电转化入金葡菌 Newman 株。提取转化子质粒,以 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ双酶切鉴定,证实获得含有 pID408 的金葡菌 Newman 株(图 1)。



M: 标准; 1: pID408; 2: *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ酶切 pID408

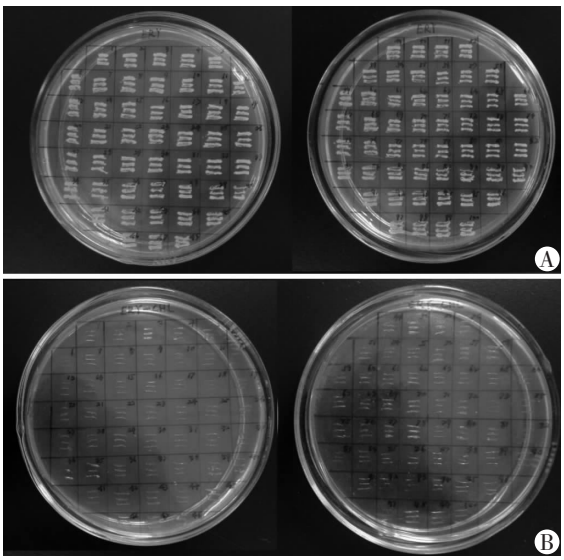
图 1 电转入金葡菌 Newman 株的质粒 pID408 酶切鉴定

2.2 转座子文库筛选

随机挑取的 100 个经诱导转座后的菌落,分别点种于 ERY^r(图 2A)和 $ERY^r CHL^r$(图 2B)平板,其均表现为 $ERY^r CHL^s$,携带有氯霉素抗性基因的 pID408 质粒丢失,携带有红霉素抗性基因的 Tn917 转座入细菌基因组,即转座子成功发生转座作用。

2.3 转座子文库评价

随机挑取的 19 个文库转座子插入位点测定结果见表 1。除 13 号与 14 号突变株转座子插入位点只相差 1 位外,其余各突变株转座子插入位点无相互重复或接近。上述结果提示该文库转座子插入随机性良好,可用于后续实验研究。



A:含红霉素的 TSB 琼脂平板; B: 含红霉素和氯霉素的 TSB 琼脂平板

图 2 随机挑取的 100 个诱导转座后菌落均表现为 $ERY^r CHL^s$,即均成功发生转座

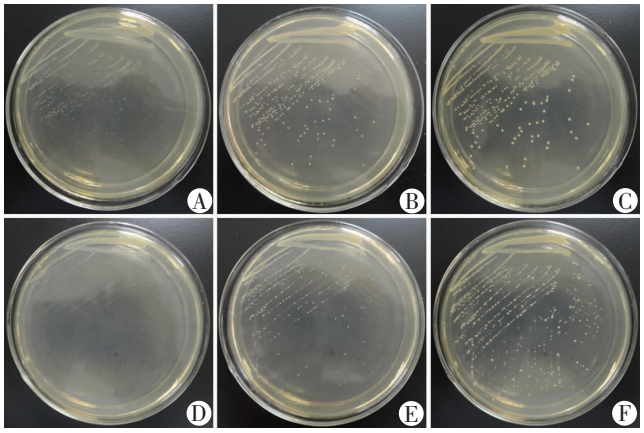
表 1 转座子插入位点测定结果显示转座子插入随机性良好

序号	转座子插入基因组的位置(bp)
1	2 178 879 与 2 178 878 之间
2	661 384 与 661 383 之间
3	2 066 660 与 2 066 661 之间
4	752 821 与 752 820 之间
5	1 422 662 与 1 422 663 之间
6	1 355 559 与 1 355 558 之间
7	924 092 与 924 091 之间
8	1 449 922 与 1 449 923 之间
9	1 432 914 与 1 432 913 之间
10	1 437 278 与 1 437 279 之间
11	1 479 649 与 1 479 650 之间
12	1 333 248 与 1 333 247 之间
13	1 333 247 与 1 333 246 之间
14	869 925 与 869 926 之间
15	1 425 336 与 1 425 337 之间
16	2 048 740 与 2 048 739 之间
17	1 414 277 与 1 414 276 之间
18	224 110 与 224 111 之间
19	1 407 266 与 1 407 265 之间

2.4 T18、T18s 突变株的筛选

实验证实,T18 与 T18s 株转座子插入位点相同,但 T18s 的其他遗传物质改变未知。同时,野生株、T18 及 T18s 株对 DAP 的 MIC 经实验证实均相同,即其不存在遗传性耐药性差异。无抗 TSA 平板培养实验结果显示,T18s 株生长速度显著慢于 T18 株,表现为在培养第 12、17 h 及 24 h T18s 株菌落大小明显小于 T18 株,即产生小菌落(图 3)。生长曲线结果显示:至培养

24 h,T18 与 T18s 株 $D(600)$ 值基本相等,虽野生株 $D(600)$ 值较高,但三者均达到了比较平稳的稳定期;同时,T18s 表现出迟缓期延长近 3 h(图 4)。



A~C:分别为 T18 菌株培养 12、17、24 h;D~F:分别为 T18s 菌株培养 12、17、24 h

图 3 相同培养时间点 T18s 株与 T18 株菌落大小对比

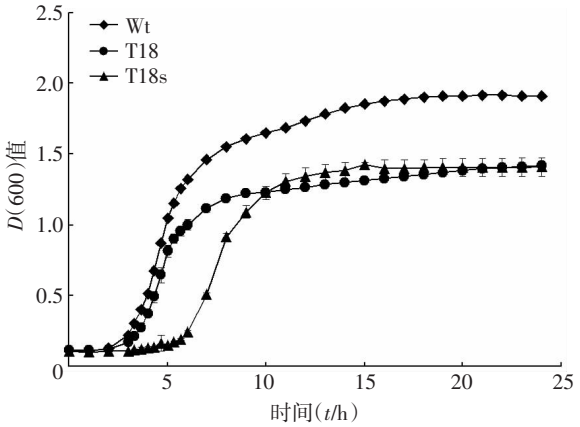
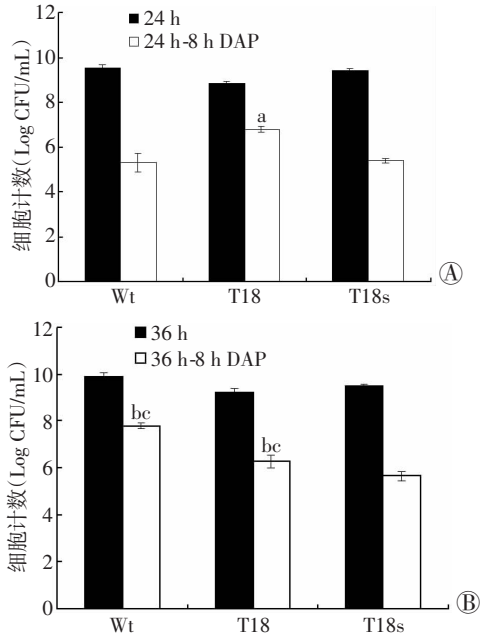


图 4 金葡菌 Newman 野生株(wt)、T18 及 T18s 株生长曲线

2.5 野生株、T18、T18s 菌株持留性实验结果

野生株、T18 及 T18s 菌株持留性实验结果见图 5。①比较相同时间点的 3 株细菌,在抗生素作用前,野生株与 T18s 株的 24 h 和 36 h 菌液活菌数目差异无显著性($P>0.05$),而 T18 株活菌数目偏低;24 h 菌液经 DAP 作用后,野生株与 T18s 株活菌数目差异仍无统计学意义($P>0.05$),而 T18 株活菌数目反而显著高于前两者($P<0.05$);36 h 菌液经 DAP 作用后,3 株细菌间活菌数目差异均有显著性($P<0.05$),但以野生株活菌数目最多,T18s 株次之。②经 DAP 处理后,36 h 与 24 h 菌液相较,野生株活菌数目显著升高,T18 株活菌数目显著降低($P<0.05$),而 T18s 株活菌数目差异无统计学意义($P>0.05$)。③虽然 T18s 生长曲线显示出延长的迟缓期,但相较于野生株与 T18 株,其持留性不但没有增加,反倒相对较低。



a:$P<0.05$,与其他 2 株细菌比较;b:$P<0.05$,与 36 h-8 h DAP T18s 比较;c:$P<0.05$,与 24 h-8 h DAP 同菌株比较

A:24 h;B:36 h

图 5 野生株(wt)、T18 及 T18s 株持留性实验结果

3 讨论

1944 年,Bigger[9] 发现金黄色葡萄球菌经青霉素作用后并不会被全部杀死,始终有一部分细菌存活下来,且这部分细菌并没有发生可以稳定遗传的基因改变,为了和通常意义上的抗生素耐药菌加以区分,将其命名为持留菌。虽然持留菌很早便被发现,但由于其不可遗传等特性,研究不便,且当时人们关注的焦点是细菌对抗生素的耐药性,故有关持留菌的研究长期被搁置。直到 1983 年,Moyed 等[10] 利用化学诱变的方法得到大肠埃希菌高持留性突变株 hipA7,由此开启了持留菌研究的新篇章。之后,通过转座子文库、定点敲除文库、表达文库及转录组分析等方法,持留性相关基因研究不断取得新的成果,发现了多种持留相关基因,并认为持留菌与细菌 TA 系统及自身代谢等密切相关,目前对细菌持留性的研究主要集中在大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、结核分枝杆菌,在这些细菌中,已鉴定到多个持留相关基因[2]。而金葡菌虽然在临床感染性疾病中具有重要地位,但目前对其持留性的研究多局限于一些表观现象的观察,如不同抗菌药物杀菌作用的动态学过程[7]、dnaK[11] 及 phoU[12] 对金葡菌持留性可能存在一定影响等,对金葡菌持留性及其机制尚缺乏全面深入的探讨。为此,我们构建了金葡菌转座子突变文库,为深入研究金葡菌持留性奠定基础。

我们利用含有转座子 Tn917 的质粒 pID408 进行金葡菌 Newman 株转座子文库的构建,期望从文库中得到持留性变化菌株以进行深入研究。转座子是存在于染色体上可自主复制和移位的 DNA 片段,建立转座子文库是进行基因研究的重要手段。由于本实验的转座子文库以单菌落的集合形式构建,采用大量突变菌株进行转座频率的计算操作较繁琐难以实现,所以我们随机挑取了 100 个单菌落验证转座是否成功。诱导转座后,理论上质粒有三种转归[6]:(1)质粒丢失,不伴随转座作用发生,此时菌落应表现为 ERY^sCHL^s;(2)质粒丢失,转座子发生转座作用,此时菌落应表现为 ERY^rCHL^s;(3)整个质粒插入到细菌基因组中,即发生复制子融合,此时菌落应表现为 ERY^rCHL^r。经证实,挑取的 100 个文库子均成功发生了转座作用,可以认为文库转座效率较高。转座子文库质量评价的另一项重要指标是转座子插入的随机性,我们随机挑取了 19 个文库子,转座子插入位点测定结果显示,该文库的转座子插入随机性好。成功构建的金葡菌转座突变文库不仅可以应用于持留性相关研究,也可用于金葡菌其他多种基因相关研究。

从金葡菌转座文库中筛选到的 T18 株转座子插入位点位于嘧啶合成相关基因 pyrD 内,嘧啶合成受损后会影响到细菌的代谢活动,从而造成细菌持留性的改变;同时,具备类似缺陷的细菌很可能在某些抗菌药物作用下产生小菌落等特殊表型,并由此改变对抗菌药物的敏感性[8],故我们以 CIP 作用于 T18 株,得到了稳定遗传的小菌落突变株 T18s。T18s 株转座子插入位点与 T18 株相同,主要表现为生长速度缓慢,疑似金葡菌小菌落突变株(small colony variants,SCV)。SCV 被认为是由于细菌在长期药物治疗或环境压力等作用下,发生点突变而致使呼吸链或胸腺嘧啶合成缺陷,致生长速度缓慢呈现小菌落形态,并伴随色素、溶血活性、毒性代谢产物降低等改变[8]。T18s 株有可能是在 T18 株基础上发生了 SCV 相关基因的突变,T18s 具体的基因突变机制还有待探讨。

后续针对野生株、T18、T18s 菌株的持留性实验显示,比较相同时间点的 3 株细菌,24 h T18 株活菌数目虽然较野生株及 T18s 株偏少,但其经 DAP 作用后剩余的活菌数目却是最多的,36 h T18 株经 DAP 作用后活菌数目也显著大于 T18s。其可能原因是 T18 株 pyrD 基因的转座子插入突变导致了其对 DAP 敏感性降低,而 T18s 株的某个或某些基因改变又使这种降低的敏感性得到了一定程度的逆转。经 DAP 作用后,36 h 与 24 h 菌液相比较,野生株持留性显著升高多至 $10^2 \sim 10^3$ 倍,T18 株持留性却显著降低,而 T18s 株持留性未产生显著变化,我们推测其可能原因是,不同菌株在不同的生长时间点,细菌某些蛋白表达或代谢产物、信号分子等存在差异,从而造成相关通路的激活或抑制,进而导致持留性的差异。同时,野生株、T18 株、T18s 株的 36 h 菌液较 24 h 菌液持留性分别呈现升高、降低、不变 3 种情况,为后续实验分析持留性产生差异原因提供了很好的素材,这也将是我们下一步实验的重要内容之一。此外,T18s 株虽然相较于野生株和 T18 株迟缓期延长,但其持留性不但没有增加,反而有所降低,这与既往文献报道的观点不同[13],提示迟缓期的长短与细菌持留性的关系还有待进一步探究。

参考文献:

[1] 程航, 曾方银, 胡启文, 等. 广州地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子分型及耐药性分析[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 696 - 701.

[2] Lewis K. Persister cells[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 357 - 372.

[3] 孙凤军, 枉前, 夏培元. 临床分离金黄色葡萄球菌生物膜相关基因的 PCR 分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(15): 1447 - 1449.

[4] Balaban N Q, Merrin J, Chait R, *et al*. Bacterial persistence as a phenotypic switch[J]. Science, 2004, 305(5690): 1622 - 1625.

[5] Balaban N Q, Gerdes K, Lewis K, *et al*. A problem of persistence: still more questions than answers? [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(8): 587 - 591.

[6] Cucarella C, Solano C, Valle J, *et al*. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2001, 183(9): 2888 - 2896.

[7] Lechner S, Lewis K, Bertram R. *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2012, 22(4): 235 - 244.

[8] Melter O, Radojevic B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*: review[J]. Folia Microbiol (Praha), 2010, 55 (6): 548 - 558.

[9] Bigger J W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation[J]. Lancet, 1944, 244(6320): 497 - 500.

[10] Moyed H S, Bertrand K P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis[J]. J Bacteriol, 1983, 155(2): 768 - 775.

[11] Singh V K, Utaida S, Jackson L S, *et al*. Role for *dnaK* locus in tolerance of multiple stresses in *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 9): 3162 - 3173.

[12] Overton IM, Graham S, Gould K A, *et al*. Global network analysis of drug tolerance, mode of action and virulence in methicillin-resistant *S. aureus*[J]. BMC Syst Biol, 2011, 5: 68.

[13] Wang X, Lord M D, Cheng H Y, *et al*. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(10): 855 - 861.

(**收稿**:2013-11-05;**修回**:2013-12-30)

(编辑 邓强庭)